

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-276783  
 (43)Date of publication of application : 20.10.1998

(51)Int.CI.

C12N 15/09  
 C12N 1/21  
 C12N 9/14  
 // (C12N 15/09  
 C12R 1:92 )  
 (C12N 1/21  
 C12R 1:19 )  
 (C12N 9/14  
 C12R 1:19 )

(21)Application number : 09-090706

(71)Applicant : EISAI CO LTD

(22)Date of filing : 09.04.1997

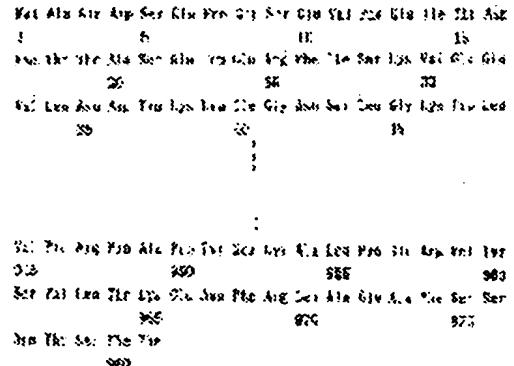
(72)Inventor : TAKAI YOSHIMI

## (54) PROTEIN FOR ACCELERATING HYDROLYSIS OF GTP

## (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new protein having an activity for accelerating the hydrolysis of GTP bound to a lipid-modified Rab3 subfamily member, and useful for clarifying mechanisms for releasing neurotransmitters and controlling the secretion of hormones and for clarifying relations with diseases.

SOLUTION: This protein comprises a protein having an amino acid sequence of the formula or the amino acid sequence of the formula wherein one to several amino acids are replaced, deleted or added, and having an activity for specifically stimulating the hydrolysis of GTP bound to Rab3 subfamily member modified with a lipid. The protein is useful for clarifying mechanisms for controlling the release of neurotransmitters and the secretion of hormones and for clarifying the relations with diseases, etc., as a control factor specifically acting on the Rab3 subfamily member related to vesicle transport in cells. The protein is obtained by purifying a synaptic soluble fraction from a rat brain by column chromatography.



(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-276783

(43)公開日 平成10年(1998)10月20日

(51)Int.Cl.  
C 12 N 15/09  
1/21  
9/14  
// (C 12 N 15/09  
C 12 R 1:92)  
Z N A

識別記号  
Z N A

F I  
C 12 N 15/00  
1/21  
9/14  
Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 16 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平9-90706

(71)出願人 000000217

エーザイ株式会社

東京都文京区小石川4丁目6番10号

(72)発明者 高井 義美

兵庫県神戸市西区学園東町2-5-73

(74)代理人 弁理士 清水 初志

(22)出願日 平成9年(1997)4月9日

(54)【発明の名称】 GTP加水分解促進タンパク質

(57)【要約】

【課題】 Rab3サブファミリーに特異的な制御因子を単離することを課題とする。

【解決手段】 基質として脂質修飾されたRab3Aを用いた連続的なカラムクロマトグラフィーによりラットの脳のシナプス可溶性分画からGAPを精製し単離することに成功した。さらに、単離したGAPの配列を基に作製したプローブを用いて、該GAPをコードするヒトcDNAを単離することに成功した。単離したGAPについてその機能を解析したところ、該タンパク質が、脂質修飾されたRab3サブファミリーメンバーに結合したGTPの加水分解を特異的に促進する活性を有することを見いたした。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 脂質修飾されたRab3サブファミリーメンバーに結合したGTPの加水分解を特異的に促進する活性を有するタンパク質。

【請求項2】 哺乳類由来である請求項1に記載のタンパク質。

【請求項3】 配列番号：1に記載のタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列を有し、脂質修飾されたRab3サブファミリーメンバーに結合したGTPの加水分解を特異的に促進する活性を有するタンパク質。

【請求項4】 配列番号：2に記載のDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、脂質修飾されたRab3サブファミリーメンバーに結合したGTPの加水分解を特異的に促進する活性を有するタンパク質。

【請求項5】 請求項1～4に記載のタンパク質をコードするDNA。

【請求項6】 請求項5に記載のDNAを含むベクター。

【請求項7】 請求項6に記載のベクターを保持する形質転換体。

【請求項8】 請求項7に記載の形質転換体により產生される組み換えタンパク質。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、細胞内小胞輸送に関するRab3サブファミリーメンバーに特異的に作用する制御因子、該因子をコードするDNA、該DNAを含むベクター、該ベクターを保持する形質転換体、該形質転換体により產生される組み換えタンパク質に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 Rab (Ras-like proteins in rat brain) スモールGタンパク質ファミリーは哺乳動物において約30種及び酵母において約10種のメンバーからなり、ドナー膜からの小胞の出芽、小胞のアクセプター膜との結合及び融合を含む細胞内小胞輸送に関係している (Takai, Y., et al. (1992) *Int. Rev. Cytol.* 133, 187-230, Takai, Y., et al. (1993) *Ciba Foundation Symposium on the GTPase superfamily* 128-146, Simons, K. and Zerial, M. (1993) *Neuron* 11, 789-799, Novick, P. and Breenwald, P. (1993) *Cell* 75, 597-601, Nuoffer, C. and Balch, W. E. (1994) *Annu. Rev. Biochem.* 63, 949-990, Pfeffer, S. R. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 522-526, Takai, Y., et al. (1996) *Genes To Cells* 1, 615-632)。いくつかのRabファミリーメンバーは高相同意性膜をもつサブファミリーを構成している。RabファミリーメンバーはGDP結合非活性形態及びGTP結合活性形態の2つの形態間を循環し、これに応じて細胞質ゾル及び膜部位間を循環する。これら循環する2つの型は小胞輸送におけるこれらメンバーの作用に必須である (Takai, Y., et al. (1992)

*Int. Rev. Cytol.* 133, 187-230, Takai, Y., et al. (1993)

*Ciba Foundation Symposium on the GTPase superfamily* 128-146, Simons, K. and Zerial, M. (1993) *Neuron* 11, 789-799, Novick, P. and Breenwald, P. (1993) *Cell* 75, 597-601, Nuoffer, C. and Balch, W. E. (1994) *Annu. Rev. Biochem.* 63, 949-990, Pfeffer, S. R. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 522-526, Takai, Y., et al. (1996) *Genes To Cells* 1, 615-632)。非活性なGDP結合形態は「Rab GDI」と結合して、細胞質ゾル中に存在する。この形態

10 10は「Rab GEP」の作用により活性なGTP結合形態へと変化する。小胞の出芽過程においては、GTP結合活性形態はドナー膜と相互に作用し小胞の出芽を引き起こす。出芽の前、途中、または後に、GTP結合形態は「Rab GAP」の作用によりGDP結合非活性形態へ変化する。小胞がアクセプター膜に結合する過程においては、GTP結合活性形態は小胞と相互に作用し、小胞をアクセプター膜へと転移させる。小胞のアクセプター膜への融合の前、途中、または後に、GTP結合活性形態は「Rab GAP」の作用によりGDP結合非活性形態へ変化する。RabはGDP結合非活性形態に変化すると、再び「Rab GDI」と結合し、細胞質ゾルへと戻る。

【0003】 Rabファミリーメンバーに対するこれら3つのタイプの制御因子の中で、「RabGDI」は実験が行われたすべてのRabファミリーメンバーに作用することが知られている (Sasaki, T., et al. (1991) *Mol. Cell Biol.* 11, 2909-2912, Garrett, M. D., et al. (1993) *FEBS Lett.* 331, 233-238, Soldati, T., et al. (1993) *Mol. Biol. Cell* 4, 425-434, Ullrich, O., et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 18143-18150, Beranger, F., et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 13637-13643)。一方、「GAP」に関しては、酵母のRabファミリーメンバーのうち、「Ypt1」および「Sec4」には作用せず、「Ypt6」及び「Ypt7」に作用する1つのGAPが単離されている (Storm, M., et al. (1993) *Nature* 361, 736-739)。しかし、RabファミリーメンバーまたはRabサブファミリーに特異的なGAPは哺乳動物において同定されていない。また、「GEP」に関しては、RabファミリーメンバーまたはRabサブファミリーに特異的なGEPは酵母及び哺乳動物において同定されていない。

【0004】 ところで、Rabサブファミリーのうち、Rab 40 3サブファミリーは、「Rab3A」、「Rab3B」、「Rab3C」、及び「Rab3D」の4のメンバーから構成されている (Pfeffer, S. R. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 522-526)。これらのメンバーの中で、「Rab3A」及び「Rab3C」はCa<sup>2+</sup>依存性エキソサイトシスに関係し、特に神経末端からの神経伝達物質放出という脊椎動物にとって極めて重要な機能に関係している。一方、「Rab3B」は下垂体細胞でCa<sup>2+</sup>依存性エンドサイトシスに関与し、「Rab3D」は脂肪細胞でインスリン依存性のグルコーストランスポーターの輸送に関与していることが示唆されている。従つて、Rab3サブファミリーに特異的な制御因子が単離され

れば、神経伝達物質の放出やホルモン分泌の制御機構の解明やその異常による疾患の病態の解明や治療法の開発などに利用でき産業上非常に有用である。Rab3サブファミリーのうち、Rab3Aに作用する「GEP」及び「GAP」はラット脳から部分的には精製されているが(Burstein, E. S., et al. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 2689-2692, Burstein, E. S., and Macara, I. G. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 1154-1158)、これら分子の一次構造及び正確な特性(例えば、Rab3Aに対する特異性など)については明らかになっていない。即ち、Rab3サブファミリーに特異的な制御因子についてはほとんど解明されていないのが現状である。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、Rab3サブファミリーに特異的な制御因子を単離することを課題とする。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、基質として脂質修飾されたRab3Aを用いた連続的なカラムクロマトグラフィーによりラットの脳のシナプス可溶性分画からGAPを精製し単離することに成功した。さらに、本発明者らは、単離したGAPの配列を基に作製したプローブを用いて、該GAPをコードするヒトcDNAを単離することに成功した。本発明者らは、単離したGAPについてその機能を解析したところ、該タンパク質が、脂質修飾されたRab3サブファミリーメンバーに結合したGTPの加水分解を特異的に促進する活性を有することを見いだした。

【0007】即ち、本発明はRab3サブファミリーメンバーに特異的な制御因子に關し、より具体的には、(1) 脂質修飾されたRab3サブファミリーメンバーに結合したGTPの加水分解を特異的に促進する活性を有するタンパク質、(2) 哺乳類由来である(1)に記載のタンパク質、(3) 配列番号：1に記載のタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列を有し、脂質修飾されたRab3サブファミリーメンバーに結合したGTPの加水分解を特異的に促進する活性を有するタンパク質、(4) 配列番号：2に記載のDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、脂質修飾されたRab3サブファミリーメンバーに結合したGTPの加水分解を特異的に促進する活性を有するタンパク質、(5) (1)～(4)に記載のタンパク質をコードするDNA、(6) (5)に記載のDNAを含むベクター、(7) (6)に記載のベクターを保持する形質転換体、(8) (7)に記載の形質転換体により產生される組み換えタンパク質、に関する。

## 【0008】

【発明の実施の形態】本発明は、脂質修飾されたRab3サブファミリーメンバーに結合したGTPの加水分解を特異

的に促進する活性を有するタンパク質に関する。

【0009】本発明のタンパク質に含まれる配列番号：1に記載のタンパク質は、基質として脂質修飾されたRab3Aを用いた連続的なカラムクロマトグラフィーによりラットの脳のシナプス可溶性分画から精製されたタンパク質である。該タンパク質は、Rab3サブファミリーメンバー(Rab3A, Rab3B, Rab3C, Rab3D)に特異的に作用する。また、脂質修飾を受けたRab3にのみ作用し、脂質修飾を受けないRab3には作用しない。これらの事実から配列番号：1に記載のタンパク質は、例えば、神経細胞では神経伝達物質の放出に関与した活性型Rab3サブファミリーメンバーに作用して、該メンバーを不活性型に変化させ、神経伝達物質の放出を阻害するなどの機能を有していると考えられる。

【0010】なお、当業者にとっては、周知技術である部位特異的変異誘発法(Sambruck, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)などを用いて、配列番号：1に記載のタンパク質中のアミノ酸を適宜置換などすることにより配列番号：1に記載のタンパク質の機能的同等物を得ることは常套手段である。従って、配列番号：1に記載のタンパク質中のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、脂質修飾されたRab3サブファミリーメンバーに結合したGTPの加水分解を特異的に促進する活性を有するタンパク質も本発明の範囲に含まれる。

【0011】また、当業者にとっては、周知技術であるハイブリダイゼーション技術(Sambruck, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)を用いて、配列番号：2に記載のDNA配列(またはその一部)を基に、これと相同性の高いDNAを単離して、該DNAから本発明のタンパク質の機能的同等物を得ることも常套手段である。従って、配列番号：2に記載のDNA配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、脂質修飾されたRab3サブファミリーメンバーに結合したGTPの加水分解を特異的に促進する活性を有するタンパク質も本発明の範囲に含まれる。ハイブリダイズ技術により得られたタンパク質は、本発明のタンパク質とアミノ酸配列において70%以上の相同性を有することが好ましく、80%以上の相同性を有することがさらに好ましく、90%以上の相同性を有することがさらに好ましい。

【0012】なお、本発明において、「脂質修飾されたRab3サブファミリーメンバーに結合したGTPの加水分解を特異的に促進する活性」とは、脂質修飾されたRab3サブファミリーメンバーに結合したGTPの加水分解を促進し、脂質修飾されていないRab3サブファミリーメンバーに結合したGTP、およびRab3以外のサブファミリーメン

5  
バーに結合したGTPの加水分解を実質的に促進しない活性を指す。脂質修飾されたRab3サブファミリーメンバーに結合したGTPの加水分解を特異的に促進する活性は、後述するRab3GAPの標準的測定、overlay法などの方法で検出することが可能である。

【0013】本発明のタンパク質は、後述するカラムクロマトグラフィーなどにより調製できる。また、本発明のタンパク質は、組み換えタンパク質として調製することも可能である。組み換えタンパク質は、例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA（例えば、配列番号：2に記載のDNA）を適当なベクターに組み込んで宿主細胞に導入し、得られた形質転換体内で発現したタンパク質を精製することにより調製することが可能である。

【0014】また、本発明は、上記本発明のタンパク質をコードするDNAに関する。本発明のDNAの形態には、特に制限はない。mRNAから合成されたcDNA、ゲノムDNAの他、化学合成DNAなども本発明のDNAに含まれる。

【0015】本発明のDNAは常法（例えば、cDNAであれば、逆転写酵素等を用いてmRNAから合成後、アルカリSDS法および塩化セシウム密度勾配遠心法などにより調製する）により調製することが可能である。

【0016】また、本発明は、本発明のDNAが挿入されたベクターに関する。本発明のDNAが挿入されるベクターとしては特に制限はなく、例えば、クローニング用ベクターであれば、「pBlueScript」、「pGEM」などが挙げられ、また哺乳動物細胞発現用ベクターであれば、「pEF-BOS」、「pSRα」、「pCMV」などが挙げられる。

【0017】本発明のタンパク質を生産する目的においてベクターを使用する場合には、特に発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、大腸菌用であれば、「pGEXZT」、「pRSET」、「pTvChis」などが挙げられ、SF9細胞用であれば、「pACYM1」などが挙げられ、哺乳動物細胞用では、「pEF-Bos」、「pSRα」、「pCMV」、「pBlueScript」等が挙げられるが、これらに制限されない。

【0018】ベクターへの本発明のDNAの挿入は、例えば、文献 (Sambruck, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) に記載の方法により行うことができる。

【0019】また、本発明は、本発明のベクターが導入された宿主細胞に関する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては、本発明のベクターに適合する細胞であれば特に制限はなく、種々の動物細胞（例えば、天然の細胞の他、COS細胞、PC12細胞などの株化された細胞など）、細菌、酵母、昆虫細胞などが挙げられる。本発明のタンパク質の製造目的であれば、特に、大腸菌、SF9細胞などが好適である。

【0020】宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、文献 (Sambruck, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (198

9) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) 記載の方法に従って行うことが可能である。

【0021】形質転換体内で発現した本発明の組み換えタンパク質は、種々のクロマトグラフィー、電気泳動法、ゲル通過などの常法を適宜組み合わせて精製することが可能である。また、例えば、本発明のタンパク質をGSTやHistbとの融合タンパク質として発現させる場合には、それ自体ゲルタチオンセファロースカラム、ニッケルセファロースカラムを用いて精製することも可能である。

【0022】以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

### 【0023】

#### 【実施例】

【実施例1】 試料及び化学物質  
脂質修飾及び非修飾のRab3Aは、Rab3A cDNAを持つバキュロウイルス (baculovirus) で感染させたSf (Spodoptera frugiperda) 9細胞の膜及び可溶性分画それから精製した (Kikuchi, A., et al. (1995) Methods Enzymol. 257, 57-70)。Rab2, Rab3B, Rab3C, Rab3D, Rab5A、及びRab11の脂質修飾体を、各cDNAを持つバキュロウイルスで感染させたSf9細胞の膜分画から同様の方法で精製した。なお、 $[\gamma-^{32}P]GTP$  (185 TBq/mmol) 及び、 $[\alpha-^{32}P]GTP$  (110 TBq/mmol) はアマーシャム社より購入した。

【0024】【実施例2】 Rab3 GAPの標準的測定  
脂質修飾されたRab3A (3pmol) を、「25mM Tris/HCl (pH8.0)、10mM EDTA、5mM MgCl<sub>2</sub>、0.5mM DTT、0.3% CHAPS、及び1.5 μM  $[\gamma-^{32}P]GTP$  (1×10<sup>4</sup> cpm/pmol)」を含む反応混合液 (10 μl) 中、30°Cで10分間インキュベートした。

この反応を2.5 μlの80mM MgCl<sub>2</sub>を加えて停止した。この混合液 (12.5 μl) に、測定するサンプルを総量50 μlになるように加え、さらに30 °Cで5分間インキュベートした。この混合液をニトロセルロースフィルターに流し、フィルター上の残留放射活性をチエレンコフカウンティング (Cerenkov counting) により決定した。

【0025】【実施例3】 「overlay法」によるRab3GAP活性の測定

40 Rab3GAPの精製したサンプルに対しポリアクリラミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った (図2A)。セミドライ (semi-dry) ウエスタンブロッティング後、ニトロセルロースフィルターに結合したタンパク質を、「1%ウシ血清アルブミン、0.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.1%Triton X-100、及び5mM DTT」を含むリン酸緩衝生理食塩水中で処理し、変性を回復させた。Rab3GAP活性を検知するため、フィルターを「25mM HEPES/NaOH (pH7.0)、0.05% Triton X-100、1.25mM MgCl<sub>2</sub>、及び2.5mM DTT」を含む緩衝液中で $[\gamma-^{32}P]GTP$ -Rab3Aとともに25°Cで10分間インキュベートした。フィルターを、「25mM HEPES/NaOH (pH7.0)、5m

MgCl<sub>2</sub>、及び2.5mM DTT」を含むリン酸緩衝生理食塩水中で洗浄し、放射活性を「Fujix BAS 2000 Imaging Analyzer」で測定した。この結果、分子量約130kDaの位置にRab3GAPのバンドが検出された（図には示していない）。

【0026】[実施例4] Rab3GAPの精製

すべての精製は0~4°Cで行った。シナプス可溶性(SS)分画を200匹のラット脳から調製し (Mizoguchi, A., et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 11872-11879)、その5分の1のSS分画(450ml、315mg)を「緩衝液A」(20mM Tris/HCl (pH 7.5)、0.5mM EDTA、及び1mM DTT)で平衡したQ-セファロースFFカラム(2.6×23cm)を用いて分画した。600mlの「緩衝液A」でカラムを洗浄後、溶出を600mlの「緩衝液A」中のNaClの直線勾配(0~0.5M)、続いて120mlの「緩衝液A」中の0.5M NaClを用いて流出速度5ml/分で行い、8mlずつの分画を集めた。この結果、Rab3GAP活性の1つのピークが分画62-70で検出された。次いで、これらの分画(72ml、36mg)を集め、一方、残りのSS分画について同様の方法で同じQ-セファロースFFカラムクロマトグラフィーを4回行った。5回のQ-セファロースFFカラムクロマトグラフィーのサンプルをプールし、「緩衝液B」(20mM リン酸カリウム(pH7.5)、及び1mM DTT)720mlで希釈した。そのサンプルを「緩衝液B」で平衡させたヒドロキシアバタイトカラム(2.6×6.6cm)を用いてさらに分画した。同じ緩衝液350mlでカラムを洗浄後、溶出を「緩衝液B」中の500mlのリン酸カリウムの直線勾配(20~212mM)、続いて「緩衝液B」中の150mlの直線勾配(212~500mM)及び150mlの500mM リン酸カリウムを用いて流出速度1.25ml/分で行い、10mlずつの分画を集めた。この結果、Rab3GAP活性の1つのピークが分画29-40で検出された。次いで、この分画(120ml、18mg)を集め、240mlの「緩衝液A」で希釈した。そのサンプルを「緩衝液A」で平衡させたヘパリン-セファロースCL-6Bカラム(0.5×5cm)を用いてさらに分画した。同じ緩衝液20mlでカラムを洗浄後、溶出を「緩衝液A」中の0.5M NaClを用いて流出速度0.5ml/分で行い、1mlずつの分画を集めた。この結果、Rab3GAP活性の1つのピークが分画2-6で見られた。これらの分画(5ml、4mg)を集め、その5分の1を2mlの「緩衝液A」で希釈して「緩衝液A」中で2mlの280mM NaClで平衡させたモノQ PC 1.6/5カラムを用いて分画した。2mlの同じ緩衝液でカラムを洗浄後、溶出を、「緩衝液A」中の3mlのNaClの直線勾配(280~500mM)、続いて0.5mlのNaClの直線勾配及び緩衝液A中の0.5mlの1M NaClを用いて流出速度0.1ml/分で行い、0.1mlずつの分画を集めた。この結果、Rab3GAP活性の1つのピークが分画10及び11で検出された(図1参照)。これらの分画(0.2ml、14μg)を集め、一方、残りのヘパリン-セファロースのサンプルについては、同様の方法でモノQ カラムクロマトグラフィーを4回行った。5回のモノQ カラムクロマトグラフィーのサンプルをプールして、使用時まで-80°C

で保存した。

【0027】最後のモノQ カラムクロマトグラフィーにおいて、GAP活性は約150kDa及び約130kDaのMrを持つ2つのタンパク質の溶出パターンと一致した(図1A及びB)。このサンプルをスクロース密度勾配超遠心分離(ultracentrifugation)で分画し、さらにモノQ カラムクロマトグラフィーを行ったところ、GAP活性はこの2つのタンパク質の溶出パターンと一致した(図1C及びD)。スクロース密度勾配超遠心分離によって評価されたMrは約290kDaだった。これらの結果からRab3GAPは150kDa及び130kDaのタンパク質のヘテロダイマーであると推定される。

【0028】[実施例5] 薄層クロマトグラフィーによるRab3GAP活性の測定

[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]GTP-Rab3Aを、[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]GTPの代わりに[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]GTP用いたことを除いて実施例2の方法と同様に調製し、ニトロセルロースフィルターに流した。フィルターを洗浄後、「20mM Tris/HCl (pH8.0)、20mM EDTA、2% SDS、1mM GDP、及び1mM GTP」を含む緩衝液に65°Cで5分間、フィルターを浸すことによりRab3Aに結合したグアニヌクレオチドを溶出した。放出されたヌクレオチドを、展開液としての1M リン酸カリウムを用いてポリエチレンイミン-セルロース(マシェレー-ネーゲル(Masher ey-Nagel)社製)クロマトグラフィーにより分離し、放射活性を、「Fujix BAS 2000 Imaging Analyzer」で測定した。

【0029】この結果、最初のモノQ カラムクロマトグラフィーからのRab3GAPサンプルに薄層クロマトグラフィーによって評価されたGAP活性が確かに示された(図2B)。脂質修飾Rab3Aにおいては活性を持つが、非修飾体では活性は持たなかった(図3A)。多くのRabファミリーにおいて、Rab3A、Rab3B、Rab3C、及びRab3Dを含むRab3サブファミリーにRab3GAPは活性を示し、Rab2、Rab5A、及びRab11を含む他のRabサブファミリーには活性を示さなかった(図3B)。Rab3サブファミリーにおいて、Rab3GA PはRab3A、Rab3C、及びRab3Dには強い活性を示したが、Rab3Bには弱い活性しか示さなかった。

【0030】[実施例6] アミノ酸配列の測定

200匹のラット脳から一連のカラムクロマトグラフィーによって集めたRab3GAPのモノQサンプル(13μg)に対しSDS-PAGEを行った。Rab3GAPに対応するタンパク質(130kDaのタンパク質)バンドをゲルから切り取り、リシリエンドペプチダーゼ(lysyl endopeptidase)で切断した。切断されたペプチドは、C18逆相高圧液体カラムクロマトグラフィーにより分離した(Imazumi, K., et al. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205, 1409-1416)。このペプチドのいくつかのアミノ酸配列をペプチドシーケンサー(Shimazu PSQ-1-gas phase sequencer)で決定した。

【0031】この結果、30以上のペプチドピークが見られ、3つのアミノ酸配列が決定された。これらの配列

は、「PVPARRQRRLFDDTREAEK」(配列番号: 3)、「LTE PAPVPIHK」(配列番号: 4)、及び「DMAPLKPEGRLHOGH K」(配列番号: 5)であった。さらに、130kDaのタンパク質のN末端アミノ酸配列を決定するためにモノクサンプルの一部をSDS-PAGEにかけ、次にPVDF膜に転写したタンパク質をクーマジーブリリアントブルー(Coomassie brilliant blue)で染色した。このタンパク質に対応するタンパク質バンドを膜から切り離してペプチドシーケンサーに直接かけた。この結果、130kDaのタンパク質のN末端アミノ酸の配列が決定され、「AADSEPESEV」(配列番号: 6)であると判明した。

【0032】[実施例7] Rab3GAPの核酸配列の分子クローニング及び決定

ヒト脳cDNAライブラリーのスクリーニングにおけるハイブリダイゼーションの方法は常法(Sambrook, J., et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)にて行った。 $\lambda$ gt10ファージベクターで得られるcDNAクローニングをpBluescriptプラスミドを用いて再びクローニングした。

【0033】本発明者らはヒト脳cDNAライブラリーからcDNAをクローニングし、一次構造を決定した。この結果、ヒトcDNAは分子量が110521で981のアミノ酸を持つタンパク質をコードしていることが判明した(図4)。決定した塩基配列を配列番号: 2に、アミノ酸配列を配列番号: 1に示す。6個のアミノ酸を除いてペプチドのすべてのアミノ酸配列は配列番号: 6の配列を含んでいた。このアミノ酸配列のわずかな違いは種(species)の違いのためであると考えられる。一方、コンピューターホモロジーサーチ(computer homology search)により、この配列がジーンバンクヌクレオチドシーケンスデータベース(GenBank Nucleotide Sequence Database)にある機能が未知であるアクセション(accession)番号D31886の遺伝子と同一であることが判明した。Rab3GAPをコードするcDNAは既知のタンパク質とは有意な相同意性は見出されなかった。

【0034】[実施例8] 組換えRab3GAPの発現発現プラスミド「pRSET-Rab3GAP」及び「pGEX-2T-Rab3欠失変異体」の構築を以下の方針により行った。開始メチオニンコドンの上流及び終止コドンの下流にKpnI部位の領域を付加したRab3GAP cDNAを含む2946塩基対断片をPCR反応により合成した。この断片をKpnIで切断し、プラスミド「pRSET」(Invitrogen社製)のKpnI部位へ挿入した(得られたプラスミドを「pRSET-Rab3GAP」と命名した)。「pRSET-Rab3GAP」で大腸菌DE3を形質転換した、30°Cで4時間、1mM イソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシドを用いて発現を誘導後、細胞を50mMのリン

配列

Met Ala Ala Asp Ser Glu Pro Glu Ser Glu Val Phe Glu Ile Thr Asp

酸ナトリウム(pH7.4)及び50mM NaClを含む緩衝液中に懸濁した。この懸濁液を超音波破碎し、遠心分離した。この上清から、His6融合Rab3GAPをNi<sup>2+</sup>-NTA-アガロースカラムクロマトグラフィーにより精製した。この融合タンパク質を「50mMリン酸ナトリウム(pH7.4)、50mM NaCl、及び0.5M イミダゾール」を含む緩衝液で溶出した。欠失変異cDNA(1-909塩基対、910-1800塩基対、及び1801-2946塩基対)をPCR反応により合成し、「pGEX-2T」(Pharmacia社製)に挿入した(得られたプラスミドを「pGEX-2T-Rab3GAP欠失変異体」と命名した)。「pGEX-2T-Rab3GAP欠失変異体」を大腸菌DH5 $\alpha$ へ形質転換した。30°Cで30分、イソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシドで発現を誘導した後、細胞を10%スクロースを含む「緩衝液A」中に懸濁した。この懸濁液を超音波破碎し、遠心分離した。この上清から、GST融合Rab3GAP欠失変異体をグルタチオン結合セファロースビーズにより精製した。

【0035】これにより130kDaの組み換えタンパク質がHis6融合タンパク質として調製された。この組み換えタンパク質はRab3Aに対しGAP活性を確かに示した(図3C)。また他のRab3サブファミリーにも活性を示したが、他のRabファミリーには活性を示さなかった。配列番号: 1の1~303番目のアミノ酸、304~600番目のアミノ酸、及び601~981アミノ酸残基の組み換えタンパク質を用いた触媒ドメイン解析により、少なくとも601~981番目のアミノ酸残基に触媒ドメイン存在することが示された。なお、ノーザンプロット解析により、脳、心臓、骨格筋、腎臓、肝臓、脾臓、臍臓、精巣、及び卵巣を含むすべてのラットの組織において130kDaのタンパク質のmRNAが発現することが判明した。

【0036】

【発明の効果】本発明により、Rab3サブファミリーメンバーに特異的に作用するタンパク質が提供された。本発明のタンパク質は、特に神経伝達物質の放出に関与していると考えられるRab3サブファミリーメンバーの脂質結合形態に高い特異性を示し、このメンバーに結合したGTPの加水分解を特異的に促進する活性を示した。本発明の制御因子は、例えば、神経伝達物質の放出やホルモン分泌の制御機構や疾患との関連の解明への利用が期待される。

【0037】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 981

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

11

12

Phe Thr Thr Ala Ser Glu Trp Glu Arg Phe Ile Ser Lys Val Glu Glu  
 20 25 30  
 Val Leu Asn Asp Trp Lys Leu Ile Gly Asn Ser Leu Gly Lys Pro Leu  
 35 40 45  
 Glu Lys Gly Ile Phe Thr Ser Gly Thr Trp Glu Glu Lys Ser Asp Glu  
 50 55 60  
 Ile Ser Phe Ala Asp Phe Lys Phe Ser Val Thr His His Tyr Leu Val  
 65 70 75 80  
 Gln Glu Ser Thr Asp Lys Glu Gly Lys Asp Glu Leu Leu Glu Asp Val  
 85 90 95  
 Val Pro Gln Ser Met Gln Asp Leu Leu Gly Met Asn Asn Asp Phe Pro  
 100 105 110  
 Pro Arg Ala His Cys Leu Val Arg Trp Tyr Gly Leu Arg Glu Phe Val  
 115 120 125  
 Val Ile Ala Pro Ala Ala His Ser Asp Ala Val Leu Ser Glu Ser Lys  
 130 135 140  
 Cys Asn Leu Leu Leu Ser Ser Val Ser Ile Ala Leu Gly Asn Thr Gly  
 145 150 155 160  
 Cys Gln Val Pro Leu Phe Val Gln Ile His His Lys Trp Arg Arg Met  
 165 170 175  
 Tyr Val Gly Glu Cys Gln Gly Pro Gly Val Arg Thr Asp Phe Glu Met  
 180 185 190  
 Val His Leu Arg Lys Val Pro Asn Gln Tyr Thr His Leu Ser Gly Leu  
 195 200 205  
 Leu Asp Ile Phe Lys Ser Lys Ile Gly Cys Pro Leu Thr Pro Leu Pro  
 210 215 220  
 Pro Val Ser Ile Ala Ile Arg Phe Thr Tyr Val Leu Gln Asp Trp Gln  
 225 230 235 240  
 Gln Tyr Phe Trp Pro Gln Gln Pro Pro Asp Ile Asp Ala Leu Val Gly  
 245 250 255  
 Gly Glu Val Gly Gly Leu Glu Phe Gly Lys Leu Pro Phe Gly Ala Cys  
 260 265 270  
 Glu Asp Pro Ile Ser Glu Leu His Leu Ala Thr Thr Trp Pro His Leu  
 275 280 285  
 Thr Glu Gly Ile Ile Val Asp Asn Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asp Pro  
 290 295 300  
 Ile Gln Ala Pro His Trp Ser Val Arg Val Arg Lys Ala Glu Asn Pro  
 305 310 315 320  
 Gln Cys Leu Leu Gly Asp Phe Val Thr Glu Phe Phe Lys Ile Cys Arg  
 325 330 335  
 Arg Lys Glu Ser Thr Asp Glu Ile Leu Gly Arg Ser Ala Phe Glu Glu  
 340 345 350  
 Glu Gly Lys Glu Thr Ala Asp Ile Thr His Ala Leu Ser Lys Leu Thr  
 355 360 365  
 Glu Pro Ala Ser Val Pro Ile His Lys Leu Ser Val Ser Asn Met Val  
 370 375 380  
 His Thr Ala Lys Lys Lys Ile Arg Lys His Arg Gly Val Glu Glu Ser  
 385 390 395 400  
 Pro Leu Asn Asn Asp Val Leu Asn Thr Ile Leu Leu Phe Leu Phe Pro  
 405 410 415

13

14

Asp Ala Val Ser Glu Lys Pro Leu Asp Gly Thr Thr Ser Thr Asp Asn  
 420 425 430  
 Asn Asn Pro Pro Ser Glu Ser Glu Asp Tyr Asn Leu Tyr Asn Gln Phe  
 435 440 445  
 Lys Ser Ala Pro Ser Asp Ser Leu Thr Tyr Lys Leu Ala Leu Cys Leu  
 450 455 460  
 Cys Met Ile Asn Phe Tyr His Gly Gly Leu Lys Gly Val Ala His Leu  
 465 470 475 480  
 Trp Gln Glu Phe Val Leu Glu Met Arg Phe Arg Trp Glu Asn Asn Phe  
 485 490 495  
 Leu Ile Pro Gly Leu Ala Ser Gly Pro Pro Asp Leu Arg Cys Cys Leu  
 500 505 510  
 Leu His Gln Lys Leu Gln Met Leu Asn Cys Cys Ile Glu Arg Lys Lys  
 515 520 525  
 Ala Arg Asp Glu Gly Lys Lys Thr Ser Ala Ser Asp Val Thr Asn Ile  
 530 535 540  
 Tyr Pro Gly Asp Ala Gly Lys Ala Gly Asp Gln Leu Val Pro Asp Asn  
 545 550 555 560  
 Leu Lys Glu Thr Asp Lys Glu Lys Gly Glu Val Gly Lys Ser Trp Asp  
 565 570 575  
 Ser Trp Ser Asp Ser Glu Glu Glu Phe Phe Glu Cys Leu Ser Asp Thr  
 580 585 590  
 Glu Glu Leu Lys Gly Asn Gly Gln Glu Ser Gly Lys Lys Gly Gly Pro  
 595 600 605  
 Lys Glu Met Ala Asn Leu Arg Pro Glu Gly Arg Leu Tyr Gln His Gly  
 610 615 620  
 Lys Leu Thr Leu Leu His Asn Gly Glu Pro Leu Tyr Ile Pro Val Thr  
 625 630 635 640  
 Gln Glu Pro Ala Pro Met Thr Glu Asp Leu Leu Glu Glu Gln Ser Glu  
 645 650 655  
 Val Leu Ala Lys Leu Gly Thr Ser Ala Glu Gly Ala His Leu Arg Ala  
 660 665 670  
 Arg Met Gln Ser Ala Cys Leu Leu Ser Asp Met Glu Ser Phe Lys Ala  
 675 680 685  
 Ala Asn Pro Gly Cys Ser Leu Glu Asp Phe Val Arg Trp Tyr Ser Pro  
 690 695 700  
 Arg Asp Tyr Ile Glu Glu Glu Val Ile Asp Glu Lys Gly Asn Val Val  
 705 710 715 720  
 Leu Lys Glu Leu Ser Ala Arg Met Lys Ile Pro Ser Asn Met Trp  
 725 730 735  
 Val Glu Ala Trp Glu Thr Ala Lys Pro Ile Pro Ala Arg Arg Gln Arg  
 740 745 750  
 Arg Leu Phe Asp Asp Thr Arg Glu Ala Glu Lys Val Leu His Tyr Leu  
 755 760 765  
 Ala Ile Gln Lys Pro Ala Asp Leu Ala Arg His Leu Leu Pro Cys Val  
 770 775 780  
 Ile His Ala Ala Val Leu Lys Val Lys Glu Glu Glu Ser Leu Glu Asn  
 785 790 795 800  
 Ile Ser Ser Val Lys Lys Ile Ile Lys Gln Ile Ile Ser His Ser Ser  
 805 810 815

15

16

Lys Val Leu His Phe Pro Asn Pro Glu Asp Lys Lys Leu Glu Glu Ile  
 820 825 830  
 Ile His Gln Ile Thr Asn Val Glu Ala Leu Ile Ala Arg Ala Arg Ser  
 835 840 845  
 Leu Lys Ala Lys Phe Gly Thr Glu Lys Cys Glu Gln Glu Glu Lys  
 850 855 860  
 Glu Asp Leu Glu Arg Phe Val Ser Cys Leu Leu Glu Gln Pro Glu Val  
 865 870 875 880  
 Leu Val Thr Gly Ala Gly Arg Gly His Ala Gly Arg Ile Ile His Lys  
 885 890 895  
 Leu Phe Val Asn Ala Gln Arg Ala Ala Ala Met Thr Pro Pro Glu Glu  
 900 905 910  
 Glu Leu Lys Arg Met Gly Ser Pro Glu Glu Arg Arg Gln Asn Ser Val  
 915 920 925  
 Ser Asp Phe Pro Pro Ala Gly Arg Glu Phe Ile Leu Arg Thr Thr  
 930 935 940  
 Val Pro Arg Pro Ala Pro Tyr Ser Lys Ala Leu Pro Gln Arg Met Tyr  
 945 950 955 960  
 Ser Val Leu Thr Lys Glu Asp Phe Arg Leu Ala Gly Ala Phe Ser Ser  
 965 970 975  
 Asp Thr Ser Phe Phe  
 980

配列番号： 2

配列の種類： cDNA to mRNA

配列の長さ： 2946

配列の特徴

配列の型： 核酸

特徴を表す記号： CDS

鎖の数： 二本鎖

存在位置： 1 .. 2943

トポロジー： 直鎖状

特徴を決定した方法： E

## 配列

ATG GCT GCC GAC AGT GAG CCC GAA TCC GAG GTA TTT GAG ATC ACG GAC	48
Met Ala Ala Asp Ser Glu Pro Glu Ser Glu Val Phe Glu Ile Thr Asp	
1 5 10 15	
TTC, ACC ACT GCC TCG GAA TGG GAA AGG TTT ATT TCC AAA GTT GAA GAA	96
Phe Thr Thr Ala Ser Glu Trp Glu Arg Phe Ile Ser Lys Val Glu Glu	
20 25 30	
GTC TTG AAT GAC TGG AAA CTG ATT GGA AAC TCT TTG GGA AAG CCA CTC	144
Val Leu Asn Asp Trp Lys Leu Ile Gly Asn Ser Leu Gly Lys Pro Leu	
35 40 45	
GAA AAG GGT ATA TTT ACT TCT GGC ACA TGG GAA GAG AAA TCA GAT GAA	192
Glu Lys Gly Ile Phe Thr Ser Gly Thr Trp Glu Glu Lys Ser Asp Glu	
50 55 60	
ATT TCC TTT GCT GAC TTC AAG TTC TCA GTC ACT CAT CAT TAT CTT GTA	240
Ile Ser Phe Ala Asp Phe Lys Phe Ser Val Thr His His Tyr Leu Val	
65 70 75 80	
CAA GAG TCC ACT GAT AAA GAA GGA AAG GAT GAG TTA TTA GAG GAT GTT	288
Gln Glu Ser Thr Asp Lys Glu Gly Lys Asp Glu Leu Leu Glu Asp Val	
85 90 95	
GTT CCA CAA TCT ATG CAA GAT TTG CTG GGT ATG AAT AAT GAC TTT CCT	336
Val Pro Gln Ser Met Gln Asp Leu Leu Gly Met Asn Asn Asp Phe Pro	
100 105 110	
CCA AGA GCA CAT TGC CTG GTA AGA TGG TAT GGG CTA CGT GAG TTC GTG	384

17

18

Pro Arg Ala His Cys Leu Val Arg Trp Tyr Gly Leu Arg Glu Phe Val			
115	120	125	
GTG ATT GCC CCT GCT GCA CAC AGT GAC GCT GTT CTC AGC GAA TCT AAG		432	
Val Ile Ala Pro Ala Ala His Ser Asp Ala Val Leu Ser Glu Ser Lys			
130	135	140	
TGC AAC CTT CTT CTG AGT TCT TCT ATT GCC TTG GGA AAC ACT GGC		480	
Cys Asn Leu Leu Leu Ser Ser Val Ser Ile Ala Leu Gly Asn Thr Gly			
145	150	155	160
TGT CAG GTG CCA CTC TTT GTG CAA ATT CAC CAC AAA TGG CGA AGA ATG		528	
Cys Gln Val Pro Leu Phe Val Gln Ile His His Lys Trp Arg Arg Met			
165	170	175	
TAT GTA GGA GAA TGT CAA GGT CCT GGT GTA CGA ACT GAT TTC GAA ATG		576	
Tyr Val Gly Glu Cys Gln Gly Pro Gly Val Arg Thr Asp Phe Glu Met			
180	185	190	
GTT CAT CTT AGA AAA GTG CCA AAT CAG TAC ACT CAC TTA TCA GGT CTG		624	
Val His Leu Arg Lys Val Pro Asn Gln Tyr Thr His Leu Ser Gly Leu			
195	200	205	
CTG GAT ATC TTC AAA TCA AAG ATT GGA TGT CCT TTA ACT CCA TTG CCT		672	
Leu Asp Ile Phe Lys Ser Lys Ile Gly Cys Pro Leu Thr Pro Leu Pro			
210	215	220	
CCA GTT AGT ATT GCT ATT CGA TTT ACC TAT GTA CTT CAA GAT TGG CAG		720	
Pro Val Ser Ile Ala Ile Arg Phe Thr Tyr Val Leu Gln Asp Trp Gln			
225	230	235	240
CAG TAT TTT TGG CCT CAG CAA CCT CCA GAC ATA GAT GCC CTT GTA GGA		768	
Gln Tyr Phe Trp Pro Gln Gln Pro Pro Asp Ile Asp Ala Leu Val Gly			
245	250	255	
GGA GAA GTT GGA GGC TTG GAG TTT GGC AAG TTA CCA TTT GGT GCC TGC		816	
Gly Glu Val Gly Gly Leu Glu Phe Gly Lys Leu Pro Phe Gly Ala Cys			
260	265	270	
GAA GAT CCT ATT AGT GAA CTC CAT TTA GCT ACT ACA TGG CCT CAT CTG		864	
Glu Asp Pro Ile Ser Glu Leu His Leu Ala Thr Thr Trp Pro His Leu			
275	280	285	
ACC GAA GGG ATC ATT GTG GAT AAT GAT GTT TAT TCT GAT TTG GAT CCT		912	
Thr Glu Gly Ile Ile Val Asp Asn Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asp Pro			
290	295	300	
ATT CAA GCT CCA CAT TGG TCT GTT AGA GTT CGA AAA GCT GAG AAT CCT		960	
Ile Gln Ala Pro His Trp Ser Val Arg Val Arg Lys Ala Glu Asn Pro			
305	310	315	320
CAG TGT TTG CTA GGT GAT TTT GTC ACT GAA TTT TTT AAA ATT TGC CGT		1008	
Gln Cys Leu Leu Gly Asp Phe Val Thr Glu Phe Phe Lys Ile Cys Arg			
325	330	335	
CGA AAG GAG TCA ACT GAT GAG ATT CTT GGA CGA TCT GCA TTT GAG GAA		1056	
Arg Lys Glu Ser Thr Asp Glu Ile Leu Gly Arg Ser Ala Phe Glu Glu			
340	345	350	
GAA GGC AAA GAA ACT GCT GAT ATA ACT CAT GCT TTG TCA AAA TTG ACA		1104	
Glu Gly Lys Glu Thr Ala Asp Ile Thr His Ala Leu Ser Lys Leu Thr			
355	360	365	
GAG CCG GCA TCA GTT CCA ATT CAT AAA TTA TCA GTT TCA AAT ATG GTA		1152	
Glu Pro Ala Ser Val Pro Ile His Lys Leu Ser Val Ser Asn Met Val			
370	375	380	

19

20

CAC ACT GCA AAG AAG AAA ATC CGA AAA CAC AGA GGT GTA GAG GAG TCA  
 His Thr Ala Lys Lys Lys Ile Arg Lys His Arg Gly Val Glu Glu Ser 1200  
 385 390 395 400  
 CCG CTA AAT AAT GAT GTT CTT AAT ACT ATT CTC CTG TTC TTA TTC CCT 1248  
 Pro Leu Asn Asn Asp Val Leu Asn Thr Ile Leu Leu Phe Leu Phe Pro  
 405 410 415  
 GAT GCT GTT TCT GAG AAA CCA TTA GAT GGA ACT ACT TCA ACA GAT AAT 1296  
 Asp Ala Val Ser Glu Lys Pro Leu Asp Gly Thr Thr Ser Thr Asp Asn  
 420 425 430  
 AAT AAT CCT CCA TCA GAG AGT GAA GAC TAT AAT CTC TAC AAT CAG TTC 1344  
 Asn Asn Pro Pro Ser Glu Ser Glu Asp Tyr Asn Leu Tyr Asn Gln Phe  
 435 440 445  
 AAG TCT GCA CCA TCT GAC AGT TTA ACA TAC AAA CTG GCT TTG TGT CTC 1392  
 Lys Ser Ala Pro Ser Asp Ser Leu Thr Tyr Lys Leu Ala Leu Cys Leu  
 450 455 460  
 TGT ATG ATC AAT TTT TAC CAT GGA GGG TTG AAA GGA GTG GCA CAC CTC 1440  
 Cys Met Ile Asn Phe Tyr His Gly Gly Leu Lys Gly Val Ala His Leu  
 465 470 475 480  
 TGG CAG GAA TTT GTT CTT GAA ATG CGT TTC CGA TGG GAA AAC AAC TTT 1488  
 Trp Gln Glu Phe Val Leu Glu Met Arg Phe Arg Trp Glu Asn Asn Phe  
 485 490 495  
 CTG ATT CCA GGA TTA GCA AGT GGA CCC CCA GAT CTG AGG TGT TGT TTA 1536  
 Leu Ile Pro Gly Leu Ala Ser Gly Pro Pro Asp Leu Arg Cys Cys Leu  
 500 505 510  
 CTG CAT CAG AAA CTA CAG ATG TTA AAT TGT TGT ATT GAA AGA AAG AAG 1584  
 Leu His Gln Lys Leu Gln Met Leu Asn Cys Cys Ile Glu Arg Lys Lys  
 515 520 525  
 GCA CGT GAT GAG GGG AAA AAG ACA AGT GCT TCA GAT GTC ACT AAT ATA 1632  
 Ala Arg Asp Glu Gly Lys Thr Ser Ala Ser Asp Val Thr Asn Ile  
 530 535 540  
 TAT CCA GGG GAT GCT GGA AAA GCA GGA GAC CAG TTG GTG CCA GAT AAT 1680  
 Tyr Pro Gly Asp Ala Gly Lys Ala Gly Asp Gln Leu Val Pro Asp Asn  
 545 550 555 560  
 CTA AAA GAA ACA GAT AAG GAA AAG GGA GAG GTA GGA AAA TCT TGG GAT 1728  
 Leu Lys Glu Thr Asp Lys Glu Lys Gly Glu Val Gly Lys Ser Trp Asp  
 565 570 575  
 TCC TGG AGT GAC AGC GAA GAA TTT TTT GAA TGC CTA AGT GAT ACT 1776  
 Ser Trp Ser Asp Ser Glu Glu Glu Phe Phe Glu Cys Leu Ser Asp Thr  
 580 585 590  
 GAA GAA CTT AAA GGA AAT GGA CAA GAG AGT GGC AAG AAA GGA GGA CCT 1824  
 Glu Glu Leu Lys Gly Asn Gly Gln Glu Ser Gly Lys Lys Gly Pro  
 595 600 605  
 AAG GAG ATG GCA AAT TTA AGG CCG GAA GGA CGG CTC TAT CAG CAT GGG 1872  
 Lys Glu Met Ala Asn Leu Arg Pro Glu Gly Arg Leu Tyr Gln His Gly  
 610 615 620  
 AAA CTT ACA CTG CTG CAT AAT GGA GAA CCT CTC TAC ATT CCA GTA ACC 1920  
 Lys Leu Thr Leu Leu His Asn Gly Glu Pro Leu Tyr Ile Pro Val Thr  
 625 630 635 640  
 CAG GAA CCA GCA CCT ATG ACA GAA GAT CTG CTA GAA GAG CAG TCT GAA 1968  
 Gln Glu Pro Ala Pro Met Thr Glu Asp Leu Leu Glu Glu Gln Ser Glu

21

22

645	650	655	
GTT TTA GCT AAA TTA GGT ACA TCG GCA GAG GGG GCT CAC CTT CGA GCA			2016
Val Leu Ala Lys Leu Gly Thr Ser Ala Glu Gly Ala His Leu Arg Ala			
660	665	670	
CGC ATG CAG AGT GCC TGT CTG CTC TCA GAT ATG GAG TCT TTT AAG GCA			2064
Arg Met Gln Ser Ala Cys Leu Leu Ser Asp Met Glu Ser Phe Lys Ala			
675	680	685	
GCT AAT CCA GGT TGC TCC CTG GAA GAT TTT GTG AGG TGG TAT TCA CCC			2112
Ala Asn Pro Gly Cys Ser Leu Glu Asp Phe Val Arg Trp Tyr Ser Pro			
690	695	700	
CGG GAT TAT ATT GAA GAG GAG GTG ATT GAT GAA AAG GGC AAT GTG GTG			2160
Arg Asp Tyr Ile Glu Glu Glu Val Ile Asp Glu Lys Gly Asn Val Val			
705	710	715	720
CTG AAA GGA GAA CTG AGT GCC CGG ATG AAG ATT CCA AGC AAT ATG TGG			2208
Leu Lys Gly Glu Leu Ser Ala Arg Met Lys Ile Pro Ser Asn Met Trp			
725	730	735	
GTA GAA GCC TGG GAA ACA GCT AAG CCA ATT CCT GCT AGA AGG CAA AGG			2256
Val Glu Ala Trp Glu Thr Ala Lys Pro Ile Pro Ala Arg Arg Gln Arg			
740	745	750	
AGA CTC TTT GAT GAT ACA CGG GAA GCA GAA AAG GTG CTG CAC TAT CTG			2304
Arg Leu Phe Asp Asp Thr Arg Glu Ala Glu Lys Val Leu His Tyr Leu			
755	760	765	
GCA ATC CAG AAA CCT GCA GAC CTT GCT CGG CAC CTG TTA CCT TGT GTG			2352
Ala Ile Gln Lys Pro Ala Asp Leu Ala Arg His Leu Leu Pro Cys Val			
770	775	780	
ATT CAT GCA GCT GTA CTC AAG GTA AAG GAA GAA AGT CTC GAA AAC			
Ile His Ala Ala Val Leu Lys Val Lys Glu Glu Glu Ser Leu Glu Asn			
785	790	795	800
ATT TCT TCA GTT AAG AAG ATC ATA AAG CAG ATA ATA TCC CAT TCC AGT			2448
Ile Ser Ser Val Lys Lys Ile Ile Lys Gln Ile Ile Ser His Ser Ser			
805	810	815	
AAA GTT TTG CAC TTC CCC AAT CCA GAA GAC AAG AAA TTG GAA GAA ATC			2496
Lys Val Leu His Phe Pro Asn Pro Glu Asp Lys Lys Leu Glu Glu Ile			
820	825	830	
ATT CAC CAG ATT ACT AAT GTG GAA GCT CTC ATT GCC AGA GCT CGG TCA			2544
Ile His Gln Ile Thr Asn Val Glu Ala Leu Ile Ala Arg Ala Arg Ser			
835	840	845	
CTA AAA GCC AAG TTT GGA ACT GAG AAA TGT GAA CAG GAG GAG GAA AAG			2592
Leu Lys Ala Lys Phe Gly Thr Glu Lys Cys Glu Gln Glu Glu Lys			
850	855	860	
GAA GAT CTT GAA AGG TTT GTG AGT TGC CTG CTG GAG CAG CCT GAA GTG			2640
Glu Asp Leu Glu Arg Phe Val Ser Cys Leu Leu Glu Gln Pro Glu Val			
865	870	875	880
TTA GTC ACC GGT GCA GGA AGA GGA CAT GCT GGC AGG ATC ATT CAC AAG			2688
Leu Val Thr Gly Ala Gly Arg Gly His Ala Gly Arg Ile Ile His Lys			
885	890	895	
CTG TTT GTG AAT GCC CAG AGG GCT GCA GCT ATG ACT CCA CCA GAG GAG			2736
Leu Phe Val Asn Ala Gln Arg Ala Ala Ala Met Thr Pro Pro Glu Glu			
900	905	910	
GAA TTG AAG AGA ATG GGC TCC CCA GAG GAA AGA AGG CAG AAC TCC GTG			2784



示す。

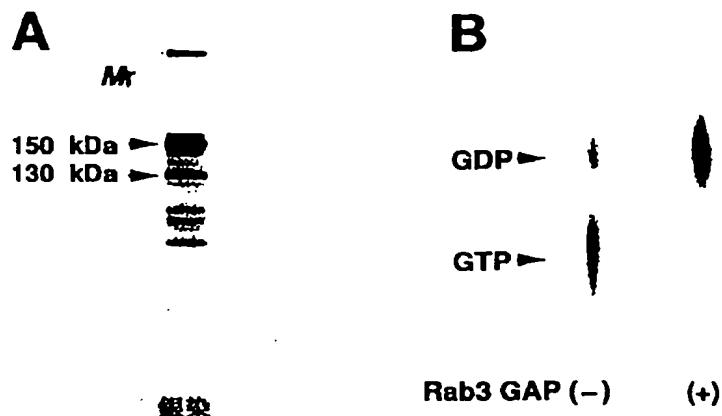
【図2】AはOverlay法にてRab3GAP活性を検出するために用いたモノQサンプルの電気泳動像である。Bは薄層クロマトグラフィーにてRab3GAP活性を検出した結果を示す図である。[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]GTP-Rab3AをRab3GAPのモノQサンプル(50ng)の存在下または非存在下で、30°Cで5分間インキュベートし、続いてフィルターに通した。Rab3Aに結合したグアニンヌクレオチドをフィルターから溶出し、溶出されたヌクレオチドを薄層クロマトグラフィーにより分離した。

【図3】Aは、Rab3GAPに対する基質の脂質修飾の必要性について検討した結果を示す図である。脂質修飾及び脂質非修飾のRab3Aに結合した[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]GTPの加水分解を様々な量のRab3GAPのモノQサンプルの存在下で測定した。(●)は脂質修飾したRab3Aを示し、(○)は脂質非修飾のRab3Aを示す。Bは、Rab3Aの基質特異性を検討した結果を

示す図である。Rabファミリーの脂質修飾体に結合した[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]GTPの加水分解をさまざまな量のモノQサンプルの存在下で測定した。(●)はRab3Aを、(▲)はRab3Bを、(■)はRab3Cを、(◆)はRab3Dを、(◇)はRab2を、(□)はRab5Aを、(○)はRab11をそれぞれ示す。Cは組換えRab3GAPのGAP活性を検出した結果を示す図である。脂質修飾されたRab3Aに結合した[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]GTPをモノQサンプルまたはRab3GAPの組換えサンプルの存在下で測定した。(●)はHis6-GAP、(○)はRab3GAPのモノQサンプルを示す。

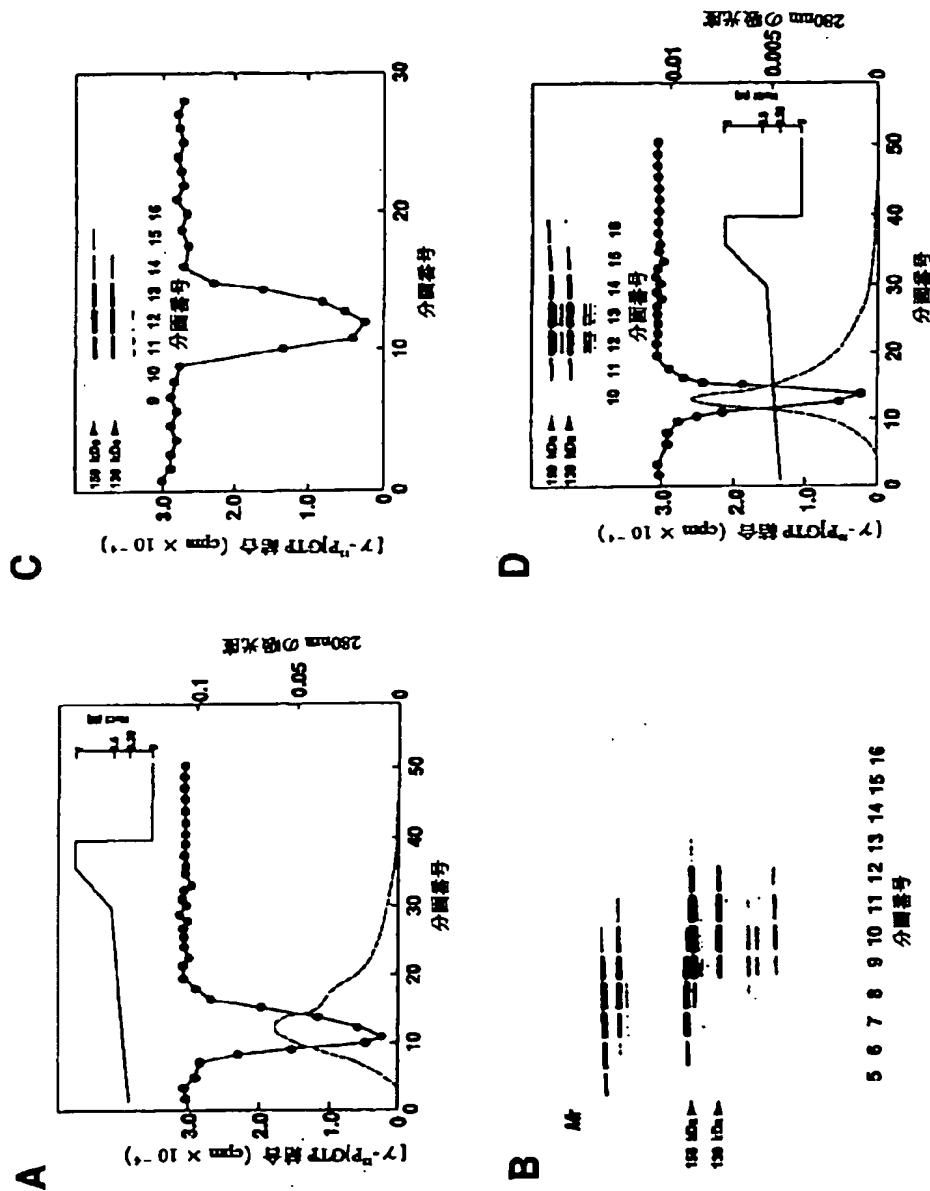
【図4】Rab3GAPの推定されたアミノ酸配列を示す図である。Rab3GAPのモノQサンプルから決定されたアミノ酸配列を下線部に示した。なお、アミノ酸の表記は生化学事典第2版(東京化学同人) p1468記載の一文字表記に従った。

【図2】

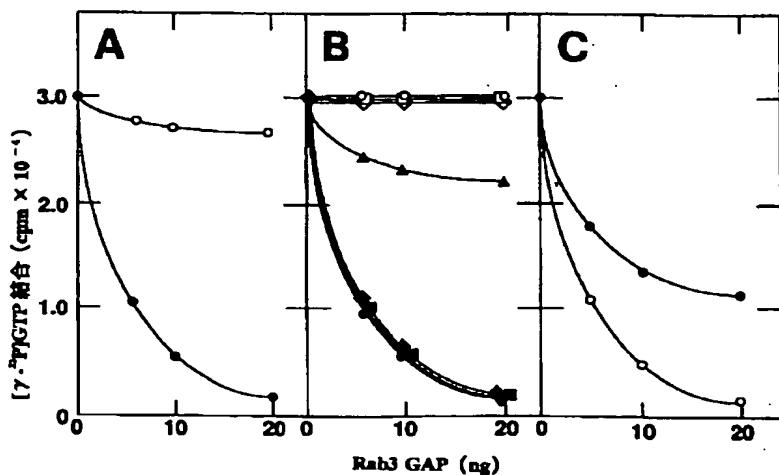


Rab3 GAP (-) (+)

【図1】



【図3】



【図4】

MAADSEPESEVFEITDFTTASEWERFISKVEEVLNQWKLIGNSLGKPLEK  
 GIFTSGTWEEKSDEISFADFKFSVTHYLVQESTDKEGKDELLEDVVPQS  
 MQDLLGMNNDFPPRAHCLVRWYGLREFVIAPIAAHSDAVLSESKCQVLL  
 SSVSIALGNTGCQVPLFVQIHHKWRMMVYGECCQPGVRTDFEMVHLRKV  
 PNQYTHLSGLLDIFKSKIGCPLTPLPPVSIARFTYVLQDWQQYFWPQQPP  
 QIDALVGEGVGGLEFGKLPFGACEDPISELHLATTWPHLTERGIVDNDVYS  
 DLDPIQAPHWSVVRKAENPQCLLGFVTEFFKICRKESTDELGRSAFE  
 EEGKETADITHALSKLTETPASVPHKLSVSNMVHTAKKKRKHRGVVEESP  
 LNNDVNLNTILLFLFPDAVSEKPLDGTTSTDNNNPPSESEDYNLYNQFKSAP  
 SDSLTYKLALCLCLOMINFYHGLKGVAHLWQEFVLEMRFRWENNFLUPGLA  
 SGPPDLRCCLLHQKLQMLNCCIERKKARDEGKKTASASDVTNIYPGAGKA  
 GDQLVPDNLKETDKKEKGEVGKSWDWSOSEEFFECLSDTEELKGNGQES  
 GIKGGPKEMANLRPEGRLYOHGKLTLJHNGEPLYIIPVTQEPAPMTELLEE  
 QSEVLAKLGTSAEGAHLRARMQSACLLSDMESFKAAANPGCSLEDFVRWY  
 SPRDYIEEVIDEKGNVVLKGELSARMKIPSNMWVEAWETAKPAPRQR  
 RLFDDTREAEKVLYLAQKPADLARHLLPCVIAAVLKVKEEESLENISS  
 VKKIKQNSHSSKVHLHPNPEDKKLEIHQITNVEALJARARSLKAFT  
 EKCEQEEKKEDLERFVSCCLLEQPEVLVTGAGRGHAQRIHKLFVNAGRAA  
 AMTPPEEELKRMGSPEERRQNSVSDFPPPAGREFILRTTVPRPAPYSKAL  
 PQRMYSVLTKEDFRLAGAFSSOTIFF

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

F 1

(C 1 2 N 1/21

(C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 N 9/14

(C 1 2 R 1:19)